

«Утверждаю»

Директор
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт химической
биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИХБФМ СО РАН)
член-корреспондент РАН, доктор химических наук
Пышный Дмитрий Владимирович

20 октября 2021



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН) о научно-практической значимости диссертационной работы Малек Анастасии Валерьевны «Возможности применения нановезикулярных технологий в онкологии», представленной к официальной защите на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 — онкология.

Актуальность диссертационной работы

С увеличением средней продолжительности жизни и снижением смертности населения от других конкурирующих причин, онкологические заболевания стали вносить все больший вклад в структуру смертности. Такие заболевания как рак предстательной железы (РПЖ), колоректальный рак (КР), рак молочной железы (РМЖ) и рак щитовидной железы (РЩ) занимают значимую долю всех типов рака. Например, РПЖ имеет тенденцию к росту заболеваемости во всем мире и находится на втором месте среди всех онкологических заболеваний у мужчин. Актуальность проблемы улучшения методов диагностики и лечения вышеперечисленных онкологических заболеваний не вызывает никаких сомнений. При этом развитие молекулярной клеточной биологии, выяснение новых механизмов эпигенетической регуляции опухолевой прогрессии и механизмов межклеточной коммуникации открывает новые перспективы как для разработки методов диагностики опухолевого процесса, так и для разработки новых подходов борьбы с ростом/метастазированием опухолей. В частности значимость открытия механизма регуляции везикулярного транспорта (Джеймс Ротман, Рэнди Шекман, Томас Зюдхоф) подтверждается фактом присуждения в 2013 году Нобелевской премии по физиологии и

медицине. Внеклеточные везикулы могут транспортировать набор молекул в число которых входят некодирующие РНК, в том числе микроРНК, представляющие собой класс коротких некодирующих РНК (19-24 п.н.), играющих важную роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток, миграции, реакции на стресс и т.д.. Впервые микроРНК были обнаружены в 1993 году, однако их активное исследование началось только с начала 2000-ых гг. после того как была найдена микроРНК let-7 и установлена связь между увеличением экспрессии микроРНК и злокачественной трансформацией клеток. Предполагается, что микроРНК могут контролировать экспрессию до 50% генов человека, и действовать по нескольким механизмам. Изменения профиля экспрессии микроРНК обнаружены при развитии большинства злокачественных опухолей, причем микроРНК могут выступать в роли онкогенов, опухолевых супрессоров и являться драйверами злокачественной трансформации. Более того, изменения профиля экспрессии микроРНК, отражающие изменения в клетках опухоли, обнаружены в биологических жидкостях, в том числе в крови и моче онкологических больных. Достоверно показано, что внеклеточные опухоль-специфичные микроРНК, находящиеся в составе микровезикул могут быть использованы в качестве биомаркеров, а их использование позволяет расширить объем диагностической информации, необходимой для улучшения диагностики и лечения онкологических заболеваний. Представленная к защите диссертация посвящена как раз разработке методологии исследования внеклеточных везикул, разработке подходов к диагностике вышеперечисленных типов рака, выяснению механизмов действия циркулирующих везикул и подходов к использованию таких везикул для терапии опухолей. Такая постановка задач и предложенные варианты их решений несомненно делают работу современной и актуальной.

Связь с планами соответствующих отраслей науки

Диссертация Малек Анастасии Валерьевны выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Утверждение аннотации диссертации Малек А.В. на тему «Циркулирующие внеклеточные нано-везикулы: роль в развитии онкологических заболеваний, возможности применения в клинической практике» состоялось на заседании Ученого совета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург) 29 ноября 2018 (выписка из протокола №10). Предварительная апробация диссертации (по месту проведения основных этапов исследования) состоялась на совместном заседании сотрудников научного отдела биологии опухолевого роста, научного отдела

инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации, научного отдела канцерогенеза и онкогеронтологии и научного отдела онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург) 14 февраля 2020 (выписка из протокола №17). По результатам апробации на заседании Ученого совета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург) была утверждена измененная тема диссертации Малек А.В. «Возможности применения нановезикулярных технологий в онкологии» 9 июня 2020 (выписка из протокола №5).

Апробация диссертации (по месту предполагаемой официальной защиты) была проведена на совместной научной конференции лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, лаборатории молекулярной эндокринологии, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории онкопротеомики и лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 30 октября 2020 года. Диссертация была принята к предварительному рассмотрению на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 3 июня 2021 (выписка из протокола №10), решение о принятии диссертации к официальной защите было принято единогласно диссертационным советом Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 24 июня 2021 года.

Проведенный анализ диссертационной работы выявил связь ее тематики с современными задачами фундаментальной медицины. Диссертационная работа успешно прошла апробацию в двух профильных ФГБУ, что подтверждает связь темы исследования с планами соответствующей отрасли науки, именно, практической онкологии.

Научная новизна исследования, практическая значимость полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В рамках диссертационного исследования автором был разработан ряд оригинальных методов выделения внеклеточных везикул из мочи и крови пациентов, исследована возможность использования миронРНК из везикул внеклеточных жидкостей для диагностики опухолевого процесса, впервые обнаружен феномен стимуляции метастатического потенциала циркулирующих опухолевых клеток нормальными нановезикулами плазмы, разработан оригинальный метод «упаковки» терапевтических молекул РНК в природные внеклеточные везикулы. Исследования хорошо спланированы, выполнены на современном уровне, отличаются научной новизной и оригинальностью.

Исследование имеет как теоретическую, так и практическую значимость. В частности, разработанные автором методы выделения нановезикул из плазмы (патент № 2741776, приоритет от 25.02.2020, патент № 2741638 приоритет от 11.03.2020) могут

найти применение в исследовательской работе и могут быть использованы при разработке новых технологий диагностики онкологических заболеваний. Выводы, сделанные автором относительно диагностической ценности анализа везикулярных микроРНК и возможностей оптимизации аналитических технологий, имеют практическое значение как этап разработки новых технологий клинической диагностики. Результаты заключительных глав диссертации, демонстрирующие эффекты внеклеточных везикул и механизмы их действия, в частности киназы фокальных контактов, имеют фундаментальное значение. Результаты, полученные автором с использованием подхода, основанного на упаковке РНК в микровезикулярные структуры открывают возможности для планирования новых экспериментов по оценке роли таких РНК *in vivo* и новых терапевтических подходов. Выводы и рекомендации диссертационной работы несомненно представляют интерес для дальнейших исследований патофизиологической роли циркулирующих везикул плазмы и разработки «везикулярных» методов доставки противоопухолевых лекарственных препаратов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и сформулированных выводов

Результаты диссертационного исследования Малек Анастасии Валерьевны изложены в четырех главах. Результаты главы, посвященной разработке методов выделения внеклеточных нановезикул из плазмы, основаны на экспериментальных результатах, качество описания результатов указывает на их достоверность, оригинальность разработанных технологий подтверждается статьями, опубликованными в рецензируемых изданиях и полученными патентами. Результаты, представленные в главе 3, основаны на анализе большого количества биологических образцов ($n=262$), полученных от пациентов с верифицированными онкологическими диагнозами, и здоровых доноров ($n=127$). Автором был выполнен огромный объем практической работы по пробоподготовке и получению данных, а также сравнительный анализ концентрации везикулярных форм «маркерных» молекул микроРНК. Статистическая обработка данных, выполненная с помощью традиционных подходов (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test, ROC (receiver operation curve) анализ, расчет показателей диагностической специфичности / чувствительности, предиктивной значимости (positive predictive value, negative predictive value)) позволили автору выбрать маркерные микроРНК и предложить диагностические системы для исследуемых типов рака. Представленные массивы данных, их опубликование в открытой печати, подтверждают достоверность полученных результатов. В следующей главе представлены результаты исследования молекулярных механизмов и биологических эффектов взаимодействия клеток рака молочной железы и нормального

пула нановезикул плазмы. Автором выделены и, в соответствии с современными требованиями, детально охарактеризованы нановезикулы плазмы. Результаты оценки стимулирующего эффекта нановезикул представлены в виде иллюстраций и описаний, без количественной оценки эффектов и статистического анализа. Последующие *in vitro* эксперименты описаны детально, с достаточным количеством технических повторов, и оценкой статистической значимости наблюдаемых различий. В связи с этим интерпретация данных адекватна полученным результатам и сделанные выводы обоснованы.

Заключительная глава описывает методы и результаты разработки оригинальной системы доставки терапевтических молекул РНК. Подробное описание методологической части позволяет оценить качество экспериментов, анализ биологических характеристик сформированных комплексов. Оценка терапевтического эффекта терапевтических РНК (в экспериментах *in vitro*, *in vivo*) выполнена с использованием необходимых контролей, с достаточным количеством технических повторов, статистическим анализом и данные о значимости наблюдаемых различий не вызывают сомнений.

В целом, выводы, сделанные автором в каждой из четырех глав, описывающих результаты, и в заключение диссертационной работы представляются обоснованными и достоверными. Все результаты представлены в высокорейтинговых англоязычных журналах или в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных научных результатов диссертаций.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа написана по принятой схеме, с некоторыми особенностями построения глав. Работа хорошо структурирована, логично построена, что упрощает понимание планируемых исследований и используемых и разрабатываемых методов и полученных научных данных. Первая глава представляет детальный обзор современной литературы, она формирует представления об объекте исследований, существующих методах выделения и анализа внеклеточных нановезикул, и результатах фундаментальных и прикладных исследований в области онкологии. На основе анализа литературы автор формулирует четыре задачи исследования, результаты решения этих задач представлены в последующих четырех главах. Так, вторая глава описывает разработанные автором оригинальные методы выделения нановезикул из мочи и плазмы. Третья глава содержит результаты анализа диагностического потенциала микроРНК из внеклеточных микровезикул при ряде онкологических заболеваний, включая колоректальный рак, рак щитовидной железы, рак молочной железы и рак предстательной железы. Четвертая глава посвящена изучению эффектов от взаимодействия нановезикул

плазмы с клетками рака молочной железы, а также молекулярных механизмов, задействованных в реализации этих эффектов. В последней, пятой главе, описаны результаты работы по созданию системы доставки терапевтических микроРНК, основанной на использовании комплексов микроРНК с полиимином, упакованных в природные внеклеточные везикулы. С учетом разнообразия поставленных автором задач, используемых для их решения методических подходов в структуре каждой главы автор выделяет «введение», «материалы и методы», «результаты» и «выводы». Такое построение глав представляется обоснованным в связи с широким кругом задач решаемых в диссертационной работе. Заключение диссертации содержит анализ полученных результатов и авторскую оценку перспектив внедрения нановезикулярных технологий в практическую онкологию.

Общий объем диссертации составляет 266 страниц, включая 12 таблиц, 44 иллюстрации, 353 литературных источника. Объем научной информации, представленной в работе, является более, чем достаточным для соискания степени доктора медицинских наук. Практически все результаты исследования представлены в 12 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации, в двух патентах и в материалах более чем 20 научных конференций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология и области исследований п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

Заключение

Диссертационная работа Малек Анастасии Валерьевны на тему «Возможности применения нановезикулярных технологий в онкологии» является законченной, самостоятельно выполненной, научно-квалификационной работой, в которой предлагаются научно-обоснованные варианты использования современных нановезикулярных технологий в практической медицине, в частности в онкологии.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Малек Анастасии Валерьевны вполне соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. №

748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – Онкология.

Отзыв на диссертацию Малек Анастасии Валерьевны обсужден и одобрен на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН), протокол № 10, 8 октября 2021 г.

Заведующий лаборатории молекулярной медицины
кандидат биологических наук,
Лактионов Павел Петрович



Подпись к.б.н. П.П. Лактионова заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
кандидат химических наук,
Пестряков Павел Ефимович



Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: (383) 363-51-50

<http://www.niboch.nsc.ru/>

niboch@niboch.nsc.ru